

Das enzymchemische Verhalten
der Lysyl-Prolin Bindung
und der Lysyl-Hydroxyprolin Bindung

Ein Beitrag zur Spezifität des Trypsins

von

LUDWIG GRIMM

1961

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilian-Universität
zu
München

Vorgelegt im Mai 1961

von

LUDWIG GRIMM

aus Neusorg



Berichterstatter: 1. Prof. Dr. W. Graßmann
2. Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1961

Dem Andenken
meiner lieben Eltern

Vorliegende Arbeit wurde im
Max-Planck-Institut
für Eiweiß- und Lederforschung
in der Zeit von
Mai 1958 bis November 1960
ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Prof. Dr. Wolfgang Graßmann,
dem Direktor des Institutes,
danke ich vielmals für die
wissenschaftliche Anleitung
und seine bereitwillige Unterstützung.

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Die Spezifität des Trypsins	1
1. Befunde an synthetischen Lysin- und Arginin- verbindungen	1
2. Befunde bei der Trypsinspaltung am Kollagen	4
3. Befunde an natürlichen Eiweißkörpern	4
4. Vergleich der Befunde aus den Spaltversuchen mit Trypsin an synth. Lysin- und Arginin- verbindungen mit den Befunden, die aus dem tryptischen Abbau natürlicher Eiweißkörper erhalten wurden	8
II. Aufgabenstellung	11
III. Peptidchemischer Teil	12
1. Methoden zur Synthese von Peptiden	12
2. Aminoschutzgruppen und Carboxylschutzgruppen	13
3. Synthesenweg für die Darstellung der Tetra- peptide L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L- Lys-L-Hypro-Gly	13
4. Synthesenwege für die Darstellung der Ver- gleichssubstanzen L-Pro-Gly, L-Hypro-Gly und L-Leu-L-Lys	17
5. Die Darstellung der Tetrapeptide L-Leu-L-Lys- L-Hypro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly	19
a) L-Leucyl-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin	19
b) L-Leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin	21
6. Die Darstellung der Vergleichssubstanzen L-Pro-Gly, L-Hypro-Gly und L-Leu-L-Lys	22
a) L-Prolyl-glycin und L-Hydroxyprolyl- glycin	22
b) L-Leucyl-L-lysin	22

7. Experimenteller Teil

A. L-Leucyl-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin .CH ₃ COOH	24
a) Carbobenzoxyl-L-leucin	24
b) ε-Carbobenzoxyl-L-lysyl-methylester	24
c) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-methylester	25
d) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-hydrazid	26
e) L-Hydroxyprolin-methylester . HCl	26
f) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-hydroxyprolin-hydrazid	27
g) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-hydroxyprolin-methylester	27
h) Glycin-benzylester . HCl	28
i) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin-benzylester	28
k) L-Leucyl-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin .CH ₃ COOH	29
B. L-Leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin . CH ₃ COOH	30
a) L-Prolin-methylester . HCl	30
b) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-prolin-methylester	30
c) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-prolin-hydrazid	31
d) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin-benzylester	31
e) L-Leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin . CH ₃ COOH	32
C. L-Prolyl-glycin	33
a) Carbobenzoxyl-L-prolin	33
b) Carbobenzoxyl-L-prolyl-glycin-benzylester	33
c) L-Prolyl-glycin	34

D. L-Hydroxypropyl-glycin	34
a) Carbobenzoxy-L-hydroxyprolin	34
b) Carbobenzoxy-L-hydroxypropyl-glycin-benzylester	34
c) L-Hydroxypropyl-glycin	35

E. L-Leucyl-L-lysin . CH_3COOH	35
a) Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin	35
b) L-Leucyl-L-lysin . CH_3COOH	36

IV. Enzymchemischer Teil	37
--------------------------	----

Experimenteller Teil	41
----------------------	----

1. Durchführung der tryptischen Spaltversuche an L-Leu-L-Lys-L-Hydro-Gly . CH_3COOH 1:100 und 1:20	41
--	----

2. Durchführung der tryptischen Spaltversuche an [L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH_3COOH] . $2\text{CH}_3\text{COOH}$ 1:20	41
--	----

a. Für die papierchromatographische Auswertung	41
--	----

b. Für die alkalimetrische Mikrotitration nach Graßmann und Heyde	42
---	----

Zusammenfassung

Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Die Spezifität des Trypsins

1. Befunde an synthetischen Lysin- und Argininverbindungen

Nach den Ergebnissen von B e r g m a n n und M i t a r b.^{1,2,3)} und V a n O r d e n und S m i t h⁴⁾ spaltet die Proteinase Trypsin Amidbindungen, an denen die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin mit ihren Carboxylgruppen beteiligt sind. Für die Wirksamkeit des Trypsins ist dabei Bedingung, daß die basischen Seitenketten des Lysins und des Arginins frei vorliegen müssen. Bergmann und Mitarb.^{1,2,3)} konnten nämlich zeigen, daß die synthetischen Verbindungen α -Benzoyl-L-lysin-amid, α -Benzoyl-L-arginin-amid, α -Hippuryl-L-lysin-amid und α -Hippuryl-L-arginin-amid von Trypsin zu den Acylaminosäuren und Ammoniak gespalten werden, während α -Benzoyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysin-amid und α -Hippuryl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysin-amid gegen Trypsin resistent sind. V a n O r d e n und S m i t h⁴⁾ fanden, dass α -Benzoyl-w-nitro-L-arginin-amid von Trypsin nicht angegriffen wird.

Andere Autoren stellten eine Reihe weiterer synthetischer Lysin- und Argininverbindungen dar. Für diese Derivate ist die Variierung der benachbarten Peptidbindung und der hydrolysierbaren Peptidbindung charakteristisch. So ergaben die tryptischen Spaltversuche von N e u r a t h und S c h w e r t⁵⁾ an p-Toluolsulfonyl-L-arginin-amid und p-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester die Spaltung beider Verbindungen. P l e n t l und P a g e⁶⁾ brachten Trypsin auf L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-tyrosin und L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure zur Einwirkung. Hierbei wurde L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-tyrosin gespalten, L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure dagegen nicht. R i e d e l, W ü n s c h und H a r t l⁷⁾ entwickelten am hiesigen Institut zur colorimetrischen Mikrobestimmung von Trypsin das α -Benzoyl-arginin- β -naphthylamid, das β -Naphthylamin als chromophore Gruppe trägt.

Auch Derivate, bei denen die benachbarte Peptidbindung entfällt, wie L-Arginyl-L-phenylalanin, L-Arginyl-L-leucin, L-Arginyl-glycin, L-Arginyl-L-glutaminsäure⁴⁾ und L-Lysin-äthylester⁸⁾ werden von Trypsin hydrolysiert. An L-Lysin-amid wurden ebenfalls Spaltversuche

von W a l e y⁹⁾ und K a t c h a l s k i¹⁰⁾ unternommen. Beide Autoren konnten über das Verhalten dieser Verbindung keine einwandfreie Aussage machen, da bei diesen Versuchen neben Lysin Dilysin und Trilysin auftraten. Sie führen diese Beobachtung auf die Wirkung des Trypsins als Transpeptidase zurück.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei den synthetischen Lysin- und Argininverbindungen die benachbarte Peptidbindung für die Spaltbarkeit durch Trypsin nicht unbedingt erforderlich ist. Auf ihre Bedeutung weisen aber schon Befunde von B e r g m a n n^{3,11)} hin, der fand, daß α -Hippuryl-L-lysin-amid und α -Hippuryl-L-arginin-amid leichter gespalten werden, als α -Benzoyl-L-lysin-amid und α -Benzoyl-L-arginin-amid. Für die spaltbare Lysin-, bzw. Argininbindung ergibt sich, daß die primäre Amidbindung durch eine sekundäre Amidbindung, wie im Falle der angeführten Peptide und des α -Benzoyl-arginin- β -naphtylamids, und durch die Esterbindung, wie eine Reihe von Neurath und Schwert untersuchter, hier nicht einzeln aufgeführter Ester zeigt, ersetzt werden kann. Eine Übersicht über das Verhalten der hier angeführten synthetischen Lysin- und Argininverbindungen gegenüber Trypsin ist in Tabelle 1 zusammengestellt (s. S. 3).

Auf Grund dieser Ergebnisse an synthetischen Lysin- und Argininverbindungen läßt sich die Spezifität des Trypsins in folgende Punkte zusammenfassen:

- a) Lysin oder Arginin müssen mit ihren Carboxylgruppen an einer primären Amidbindung, sekundären Amidbindung oder Esterbindung beteiligt sein.
- b) Die basischen Seitenketten dieser beiden Aminosäuren müssen in freiem Zustand vorliegen.
- c) Die α -Aminogruppe des Lysins, bzw. des Arginins muß nicht an einer benachbarten Peptidbindung teilnehmen, die Anwesenheit einer solchen begünstigt aber die Spaltung.
- d) Lysin, bzw. Arginin müssen in der L-Konfiguration vorliegen.

Tabelle 1

Synthetische Lysin- und Argininverbindungen

Trypsin-aktiv	Trypsin-resistent
α -Benzoyl-L-lysin-amid (1,2,3)	α -Benzoyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin-amid (1,2,3)
α -Hippuryl-L-lysin-amid (1,2,3)	
L-Tyr-L-Lys-L-Glu-L-Tyr (6)	α -Hippuryl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin-amid (1,2,3)
L-Lysin-äthylester (8)	
α -Benzoyl-L-arginin-amid(1,2,3)	L-Tyr-L-Lys-L-Glu (6)
α -Hippuryl-L-arginin-amid (1,2,3)	α -Benzoyl-w-nitro-L-arginin-amid (4)
p-Toluolsulfonyl-L-arginin-amid (5)	
p-Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester (5)	
α -Benzoyl-arginin- β -naphthylamid (7)	
L-Arginyl-L-leucin (4)	
L-Arginyl-L-phenylalanin (4)	
L-Arginyl-glycin (4)	
L-Arginyl-L-glutaminsäure (4)	

Für Punkt d) spricht die Tatsache, daß die untersuchten Trypsin-substrate in der L-Konfiguration vorlagen. Hinzu kommt, daß bei anderen proteolytischen Enzymen¹²⁾ genügend Beweise dafür vorhanden sind, daß Bindungen, an denen D-Aminosäuren beteiligt sind, nicht gespalten werden. Ferner sind Poly-D-lysin¹³⁾ und α -Benzoyl-D-arginin- β -naphthylamid⁷⁾ gegenüber Trypsin resistent.

Eine Ausnahme in diesen Spezifitätsbedingungen des Trypsins bildet lediglich die L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure. Bevor auf diese Ausnahme näher eingegangen wird, sollen zunächst die Ergebnisse betrachtet werden, die beim Abbau natürlicher Proteine und Polypeptide mit Trypsin erhalten worden sind.

2. Befunde bei der Trypsinspaltung am Kollagen

Die Spezifität des Trypsins, wie sie sich aus den Abbauprobeversuchen an synthetischen Lysin- und Argininverbindungen ergab, läßt erwarten, daß ein aus einem Protein herausgebrochenes Abbauprodukt an seinem Carboxylende entweder Arginin oder Lysin und in N-terminaler Position einen solchen Aminosäurerest tragen muß, dessen nun freie Aminogruppe vor der Spaltung mit Lysin oder Arginin verknüpft war und daß dieses Bruchstück kein mittelständiges Lysin oder Arginin enthält.

Die erste Voraussetzung trifft für die Bruchstücke, die beim Abbau von denaturiertem Kollagen mit Trypsin durch G r a ß m a n n und M i t a r b.¹⁴⁾ erhalten wurden, zu. Bei der quantitativen Aminosäurebestimmung dieser Peptide nach M o o r e und S t e i n (modifiziert von G r a ß m a n n und H a n n i g) wurde aber gefunden, daß ein Teil derselben, neben einem carboxylendständigen Lysin, bzw. Arginin, noch zusätzlich Lysin oder Arginin enthält. Aus diesem Befund war zu schließen, daß das "überschüssige" Lysin, bzw. Arginin mittelständig vorliegen müssen, d. h. diese Bindungen wurden von Trypsin nicht hydrolysiert.

Für das Kollagen ist im Gegensatz zu anderen Proteinen charakteristisch, daß es einen hohen Anteil an Prolin und Hydroxyprolin enthält. Diese beiden Iminosäuren besitzen im Unterschied zu den anderen Aminosäuren einen sekundären Stickstoff. Gehen sie mit den Carboxylgruppen des Lysins oder Arginins eine Peptidbindung ein, so kommt eine tertiäre Amidbindung zustande. Bisher lagen über das Verhalten einer solchen Bindung wohl verstreute Beobachtungen beim Abbau natürlicher Eiweißkörper vor, aber keinerlei Untersuchungen an synthetischen Verbindungen.

3. Befunde an natürlichen Eiweißkörpern

Auf die Unspaltbarkeit der Lys-Pro und der Arg-Pro Bindung weisen bereits vereinzelte Ergebnisse von B e l l¹⁵⁾, H a r r i s¹⁶⁾, M o o r e und S t e i n¹⁷⁾, S c h r a m m¹⁸⁾ und E l l i o t¹⁹⁾ hin.

Für die Beurteilung dieser Frage war es aber von Interesse zu prüfen, ob dem Prolin (Hydroxyprolin) in dieser Hinsicht eine spezifische Stellung zukommt, oder in der Sequenz Arg-X oder Lys-X nicht andere Aminosäuren an der Stelle X einen Angriff des Trypsins verhindern oder stark erschweren.

S a n g e r²⁰⁾ fand bei der Einwirkung des Trypsins auf die oxydierte B-Kette des Insulins, daß die Peptidbindungen Arg-Gly und Lys-Ala gelöst wurden:

22 23 24 25 26 27 28 29 30
Phe...Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

B e l l¹⁵⁾ stellte bei der tryptischen Spaltung des β -Corticotropins die Hydrolyse der Arg-Try, Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Arg und Lys-Val Bindungen fest:

1 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Ser...Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro

20 21 22 38
Val-Lys-Val...Phe

Die mittelständige Lys-Pro- und Arg-Pro-Bindung waren resistent.

H a r r i s²¹⁾ ließ Trypsin auf das β -MSH des Schweines einwirken. Dabei gingen die Lys-Met und die Arg-Try Bindungen auf:

1 6 7 11 12 17 18
Asp...Lys-Met...Arg-Try...Lys-Asp

Die an Lysin gebundene carboxylendständige Asparaginsäure wurde dagegen nicht abgespalten. Dieses Ergebnis wurde von G e - s c h w i n d²²⁾ bestätigt.

Lysin- oder Argininbindungen, die von Trypsin gespalten werden

--- Lysin- oder Argininbindungen, die von Trypsin nicht gespalten werden

Beim Abbau des α -MSH des Schweines, dessen 13 Aminosäuren sich in der Anfangssequenz des β -Corticotropins wiederfinden, erzielte H a r r i s¹⁶⁾ ebenfalls die Aufspaltung der Arg-Try Bindung:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

Die Lys-Pro Bindung blieb ebenso wie im β -Corticotropin ungespalten.

T u p p y²³⁾ konnte im Cytochrom c die Spaltung der Lys-Cys Bindung nachweisen.

Während die bisher angeführten Eiweißkörper mit Ausnahme des Cytochroms c in die Klasse der Polypeptide einzuordnen sind, wurden in jüngster Zeit mit Hilfe des Trypsinabbaues zwei Naturstoffe aufgeklärt, die bereits zu den Proteinen gehören. M o o r e und S t e i n¹⁷⁾ fanden die Aminosäuresequenz der Ribonuclease, und S c h r a m m¹⁸⁾ konnte die Primärstruktur des Proteins des Tabakmosaikvirus angeben. M o o r e und S t e i n schlossen aus den Bruchstücken, die sie nach Einwirkung von Trypsin auf Ribonuclease erhielten, daß folgende Lysin- und Argininbindungen gelöst wurden: Lys-Phe, Arg-Ser, Lys-Ser, Arg-Asp-NH₂, Lys-Asp, Arg-Cys, Arg-Glu, Lys-Tyr, Lys-Thr und Lys-His:

1 2 7 8 10 11 31 32 33 34
Lys-Glu...Lys-Phe...Arg-Ser...Lys-Ser...Arg-Asp-NH₂...

37 38 39 40 41 42 61 62 66 67
Lys-Asp...Arg-Cys...Lys-Pro...Lys-Asp-NH₂...Lys-Asp...

85 86 91 92 98 99 104 105 124
Arg-Glu...Lys-Tyr...Lys-Thr...Lys-His...Val

Nicht gespalten wurden die mittelständige Lys-Pro Bindung und die aminoendständige Lys-Glu Bindung.

Der Arbeit von S c h r a m m ist zu entnehmen, daß im Protein des Tabakmosaikvirus von Trypsin die Arg-Thr, Arg-Glu-NH₂, Arg-Phe, Lys-Val, Arg-Tyr, Arg-Asp-NH₂, Arg-Ileu, Arg-Arg, Arg-Ser und Arg-Gly Bindungen hydrolysiert werden.

1 41 42 46 47 53 54 61 62
Ac-Ser...Arg-Thr...Arg-Glu-NH₂...Lys-Pro...Arg-Phe...

68 69 71 72 90 91 92 93 111 112 113
Lys-Val...Arg-Tyr...Arg-Asp-NH₂...Arg-Ileu...Arg-Arg-Val...

121 122 133 134 140 141 157
Arg-Ser...Arg-Gly...Arg-Ser...Thr

Hierbei ^{53 54}widerstanden die mittelständige Lys-Pro Bindung und die Arg-Val Bindung dem Angriff des Trypsins.

Bei der Behandlung des Rinderblutes mit Trypsin konnte E l l i o t¹⁹⁾ das Bradykinin-ein Peptid, das eine blutdrucksteigernde Wirkung hat- in reiner Form isolieren und dessen Struktur^{24,25)} aufklären:

1 2 3 4 5 6 7 8 9
Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

In dieser biologisch aktiven Substanz wurde die Arg-Pro Bindung nicht gelöst.

Schließlich kann das Trypsin seine inaktive Vorstufe, das Trypsinogen, durch die Abspaltung eines Hexapeptides aktivieren, wobei eine Lys-Ileu Bindung aufgeht²⁶⁾.

Die Ergebnisse der Spaltversuche an natürlichen Eiweißkörpern mit Trypsin sind in Tabelle 2 nochmals zusammengefaßt.

Tabelle 2

Spaltversuche mit Trypsin an natürlichen Eiweißkörpern

Lysin-Bindungen		Arginin-Bindungen	
Trypsin-aktiv	Trypsin-resist.	Trypsin-aktiv	Trypsin-resist.
-Lys-Ala ¹ (20)	-Lys-Asp ¹ (21)	-Arg-Gly-(18,20)	-Arg-Val ² (18)
-Val-(14,18)	Lys ³ Glu- (17)	-Ileu(18,26)	-Arg-Pro ² (15)
-Phe- (17)	-Lys-Pro ² (15, 16,17,18)	-Phe- (18)	
-Tyr- (17)		-Try-(15,16, 21)	
-Ser- (17)		-Tyr- (18)	
-Cys- (23)		-Ser-(17,18)	
-Met- (21)		-Thr-(17,18)	
-Asp- (17)		-Cys- (17)	
-Asp-NH ₂ (17)		-Glu- (17)	
-Lys- (15)		-Glu-NH ₂ (18)	
-Arg- (15)		-Asp-NH ₂ (18)	
-His- (17)		-Arg-(15,18)	

1 = C-terminal; 2 = mittelständig; 3 = N-terminal; alle anderen, nicht näher bezeichneten Aminosäuren sind mittelständig.

4. Vergleich der Befunde aus den Spaltversuchen mit Trypsin an synth. Lysin- und Argininverbindungen mit den Befunden, die aus dem tryptischen Abbau natürlicher Eiweißkörper erhalten wurden

Während beim tryptischen Abbau an synthetischen Lysin- und Argininverbindungen lediglich die L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure nicht angegriffen wurde, finden sich bei der Einwirkung des Trypsins auf natürliche Eiweißkörper fünf weitere Ausnahmen.

So wurden im β -MSH des Schweines²¹⁾ die Lys-Asp Bindung, an der eine carboxylendständige Asparaginsäure beteiligt ist, und die Lys-Glu Bindung mit aminoendständigem Lysin in der Ribonuclease¹⁷⁾ nicht gespalten. Ferner widerstanden die mittelständigen Lys-Pro Bindungen im β -Corticotropin¹⁵⁾, im α -MSH des Schweines¹⁶⁾, in der Ribonuclease¹⁷⁾ und im Protein des Tabakmosaikvirus¹⁸⁾, die mittelständigen Arg-Pro Bindungen im β -Corticotropin¹⁵⁾ und im Bradykinin^{24,25)}, sowie die mittelständige Arg-Val Bindung im Protein des Tabakmosaikvirus¹⁸⁾ der Spaltung mit Trypsin. Die aminoendständige Arg-Pro Bindung im Bradykinin darf man als mittelständig behandeln, da das zugehörige Peptid durch Trypsin aus einem Protein herausgespalten wurde.

Die L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure als Ausnahme der synthetischen Verbindungen und die Nichtspaltbarkeit der Lys-Asp Bindung im β -MSH des Schweines kann man unter einem Gesichtspunkt betrachten. Hier sind die Glutaminsäure und die Asparaginsäure carboxylendständig. Neurath und Schwert¹²⁾ machen für die Resistenz der L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure gegen Trypsin die Anwesenheit der zweiten Carboxylgruppe der Glutaminsäure verantwortlich. Dasselbe müßte auch für die carboxylendständige Asparaginsäure zutreffen. Für diese Annahme von Neurath und Schwert spricht die Abspaltung des carboxylendständigen Alanins in der oxydierten B-Kette des Insulins²⁰⁾.

Im Gegensatz dazu steht aber das Verhalten der L-Arginyl-L-glutaminsäure⁴⁾. Dieses synthetische Dipeptid wird von Trypsin hydrolysiert. Erwartungsgemäß sollte es sogar schwerer gespalten werden als die L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutaminsäure, da im Dipeptid die benachbarte Peptidbindung fehlt. Abgeschwächt wird dieser Einwand, wenn man das Verhalten der zweiten Ausnahme innerhalb der natürlichen Eiweißkörper, der Lys-Glu Bindung in der Ribonuclease¹⁷⁾, in der Lysin aminoendständig ist, betrachtet. Diese Bindung ist gegen Trypsin wieder resistent.

Wesentlich anders ist der Fall dagegen bei den letzten drei Ausnahmen, den mittelständigen Lys-Pro, Arg-Pro und Arg-Val Bindungen

gelagert. Hier dürfte eine echte Ausnahme in der Spezifität des Trypsins vorliegen. Die anderen Ausnahmen kann man nämlich unter dem Gesichtspunkt betrachten, daß dort Trypsin als Exopeptidase wirken müßte. Trypsin ist aber von Natur aus ohne Zweifel eine Endopeptidase. Neben seiner natürlichen Aufgabe, höhere Eiweißkörper zu verdauen, weisen auch der bereits angeführte Befund von B e r g m a n n^{3,11)}, daß die benachbarte Peptidbindung die Spaltung begünstigt, und vor allem die Spaltbarkeit der mittelständigen Lys-Asp Bindung und Arg-Glu Bindung in der Ribonuclease¹⁷⁾ auf diese Tatsache hin. Ebenso wurde bei den synthetischen Verbindungen das L-Tyrosyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-tyrosin gespalten.

Dabei ist zu beachten, daß der Nichtspaltbarkeit der mittelständigen Arg-Val Bindung, wie sie von Schramm im Protein des Tabakmosaikvirus beobachtet wurde, keine allgemeine Aussage zukommen dürfte. Die mittelständige Lys-Val Bindung im gleichen Substrat wurde nämlich gelöst, ebenso die mittelständige Lys-Val Bindung im β -Corticotropin. Als echte Ausnahme in der Endopeptidase-wirkung des Trypsins gilt dann nur noch die Nichtspaltbarkeit der mittelständigen Lys-Pro und der mittelständigen Arg-Pro Bindung.

Diese Beobachtung wurde bisher nur an natürlichen Eiweißkörpern gemacht. Spaltversuche an entsprechenden synthetischen Lysinverbindungen, deren Darstellung durch ähnliche Befunde am Faserprotein Kollagen angeregt wurde, liegen erstmals in dieser Arbeit vor.

II. Aufgabenstellung

Wie bereits ausgeführt, wurde in den isolierten Abbaupeptiden, die beim tryptischen Abbau des Kollagens durch G r a ß m a n n und M i t a r b.¹⁴⁾ erhalten wurden, entgegen der Spezifität des Trypsins, Lysin und Arginin mittelständig gefunden. Da Kollagen zu fast einem Viertel Prolin und Hydroxyprolin enthält, wurde vermutet, daß die Carboxylgruppen dieses mittelständigen Lysins und Arginins mit dem Iminostickstoff des Prolins oder Hydroxyprolins tertiäre Amidbindungen eingehen, die dem Angriff des Trypsins widerstehen können. Diese Vermutung fand zwar in den Ergebnissen von B e l l¹⁵⁾ und H a r r i s¹⁶⁾ am β -Corticotropin und α -MSH des Schweines bezüglich des Prolins ihre Bestätigung, die Erscheinung als solche wurde aber von den Autoren nicht diskutiert. Da die Anfangssequenz des β -Corticotropins die Sequenz des α -MSH des Schweines einschließt, war bis zu Beginn dieser Arbeit nur das Verhalten dieser einen Lys-Pro Bindung bekannt. Das gleiche gilt für die Arg-Pro Bindung im β -Corticotropin, die im α -MSH des Schweines bereits fehlt.

Da für das Kollagen der hohe Anteil des Prolins und Hydroxyprolins und das Auftreten des Hydroxyprolins überhaupt charakteristisch sind, war es im Rahmen der Aufklärung der Aminosäuresequenz dieses Faserproteins von besonderer Bedeutung, über das Verhalten der Lys-Pro-, Lys-Hypro-, Arg-Pro- und Arg-Hypro Bindung gegenüber Trypsin Gewißheit zu erhalten. Für diese Untersuchungen schienen, auf Grund der vorhergegangenen Spezifitätsbetrachtungen über das Trypsin, am besten synthetische Tetrapeptide geeignet, die die fraglichen Bindungen mittelständig enthalten.

Es war meine Aufgabe, die Tetrapeptide L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L-Lys-Hypro-Gly zu synthetisieren und an diesen das Verhalten der Lys-Pro- und der Lys-Hypro Bindung gegenüber Trypsin zu untersuchen.

Es bestand bei den Abbaupversuchen von G r a m m a n n¹⁴⁾, B e l l¹⁵⁾ und H a r r i s¹⁶⁾ die Möglichkeit, daß diese tertiären Amidbindungen nur im geringen Maße gespalten wurden, so daß bei der Aufarbeitung der Abbaugemische ein etwaiger kleiner Anteil von Bruchstücken mit N-terminalem Prolin oder Hydroxyprolin nicht erfaßt wurde. Es war daher von Interesse, eine eventuelle Spaltung der Lys-Pro- und der Lys-Hydro-Gly Bindung in einer papierchromatographischen Anordnung hoher Empfindlichkeit zu verfolgen. Für diesen Zweck waren als Vergleichssubstanzen noch die Dipeptide L-Leu-L-Lys, L-Pro-Gly und L-Hydro-Gly darzustellen, die gemäß der Spezifität des Trypsins bei der Spaltung der Tetrapeptide L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Hydro-Gly auftreten müßten.

Die Tetrapeptide L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Hydro-Gly wurden in analytisch und chromatographisch reiner Form erhalten. Ebenso das Dipeptid L-Leu-L-Lys. Die bereits bekannten Dipeptide L-Pro-Gly und L-Hydro-Gly wurden über einen noch nicht beschriebenen Weg, bzw. nach einer anderen Methode dargestellt.

III. Peptidchemischer Teil

1. Methoden zur Synthese von Peptiden

Die erfolgreiche Darstellung eines Peptides hängt weitgehend von der Auffindung geeigneter Synthesenmethoden und der richtigen Wahl der Schutzgruppen ab. Zu den am häufigsten angewandten Synthesenmethoden zählen die Azidmethode von C u r t i u s²⁷⁾, die Säureanhydridmethode nach F o i s s o n a s²⁸⁾, das Carbodiimidverfahren von S h e e n a n²⁹⁾ und die Phosphorazomethode nach G o l d s c h m i d t³⁰⁾.

Während die Azidmethode, die Säureanhydridmethode und das Carbodiimidverfahren die direkte Einbeziehung der hydroxylhaltigen Aminosäuren in die Peptidsynthese zulassen, müssen bei Anwendung der Phosphorazomethode, wie G r a m m a n n und W ü n s c h³¹⁾ zeigten, die Hydroxylgruppen geschützt werden. Die drei erst

genannten Methoden haben außerdem gemeinsam, daß bei ihrer Anwendung, im Gegensatz zur Aminogruppe bei der Phosphorazomethode, die Carboxylgruppen aktiviert werden.

2. Aminoschutzgruppen und Carboxylschutzgruppen

Für die Maskierung der Aminogruppen haben sich in erster Linie der Carbobenzoxystoff von B e r g m a n n³²⁾ und der Triphenylrest, der zum erstenmal von Helferich³³⁾ angewendet wurde, durchgesetzt. Beide können durch katalytische Hydrierung wieder entfernt werden.

Die Carboxylgruppe wird in der Regel mit Methylalkohol verestert. Von großem Vorteil ist die Verwendung des Benzylesters. Diese Carboxylschutzgruppe kann ebenfalls durch die sehr schonend verlaufende katalytische Hydrierung abgespalten werden. Hierbei wird die Stufe der alkalischen Verseifung, die bei der Verwendung des Methylesters zusätzlich auftritt, umgangen. Beim Aufbau höherer Peptide versagt diese Methode allerdings, da die selektive Entfernung der Carbobenzoxyschutzgruppe bei der Anwesenheit des Benzylesters nicht möglich ist.

Als besonderen Nachteil für die Verwendung des Methylesters als Carboxylschutzgruppe bei der Darstellung von höheren Lysinpeptiden führt W ü n s c h³⁴⁾ die unerwünschte Nebenerscheinung der Hydantoinbildung an, die bei der alkalischen Verseifung ab dem Dicarbobenzoxy-tripeptid-ester besonders stark auftritt.

Unter Berücksichtigung der Eigenschaften der angeführten Synthesemethoden und Schutzgruppen wurden die Synthesenwege für die Darstellung der Tetrapeptide L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly ausgewählt.

3. Synthesenweg für die Darstellung der Tetrapeptide L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly

In der Regel wird ein Tetrapeptid aus zwei Dipeptidderivaten aufgebaut. Das würde für die Darstellung des L-Leu-L-Lys-L-Pro-(L-Hypro)-Gly

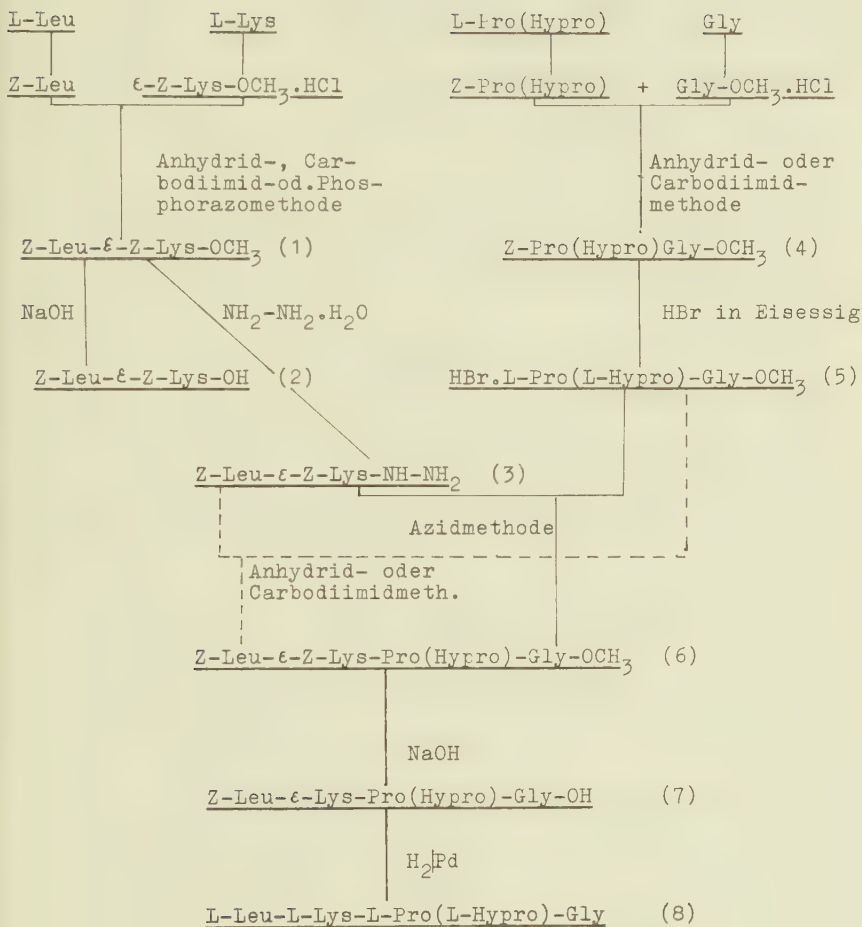
den in Schema 1 (s. S. 15) wiedergegebenen Syntheseweg bedeuten.

Die Verseifung des Z-Leu-ε-Z-Lys-Pro (Hypro)-Gly-OCH₃ (6) ließ aber nach W i n s c h³⁴⁾ schlechte Ergebnisse erwarten, da bei solchen Derivaten durch die unerwünschte Hydantointildung Nebenprodukte entstehen. Ein Ausweg wäre der Einbau des Pro(Hypro)-Gly-OBz . HBr an Stelle des Pro(Hypro)-Gly-OCH₃ . HBr (5) gewesen. Hierbei würde der Z-Leu-ε-Z-Lys-Pro(Hypro)-Gly-OBz erhalten werden, der dann durch die katalytische Hydrierung, unter Umgehung der Verseifung, direkt in das freie Tetrapeptid übergeführt werden könnte.

Wie ich in meiner Diplomarbeit zeigen konnte, war dieser Weg nicht beschreitbar, da die selektive Entfernung des Carbobenzoxystrestes im Carbobenzoxy-prolyl-glycin-benzylester mit HBr in Eisessig nicht möglich ist. Es wird hierbei auch der Benzylester teilweise angegriffen, so daß freies Pro-Gly auftritt. Um aber trotzdem zu dem Dicarbobenzoxy-tetrapeptid-benzylester zu gelangen, wurde von der üblichen Darstellungsweise eines Tetrapeptides über zwei Dipeptidderivate abgewichen und ein Syntheseweg gewählt, dem der schrittweise Aufbau der Tetrapeptide aus den Aminosäuren zugrunde lag (s. Schema 2, S. 16).

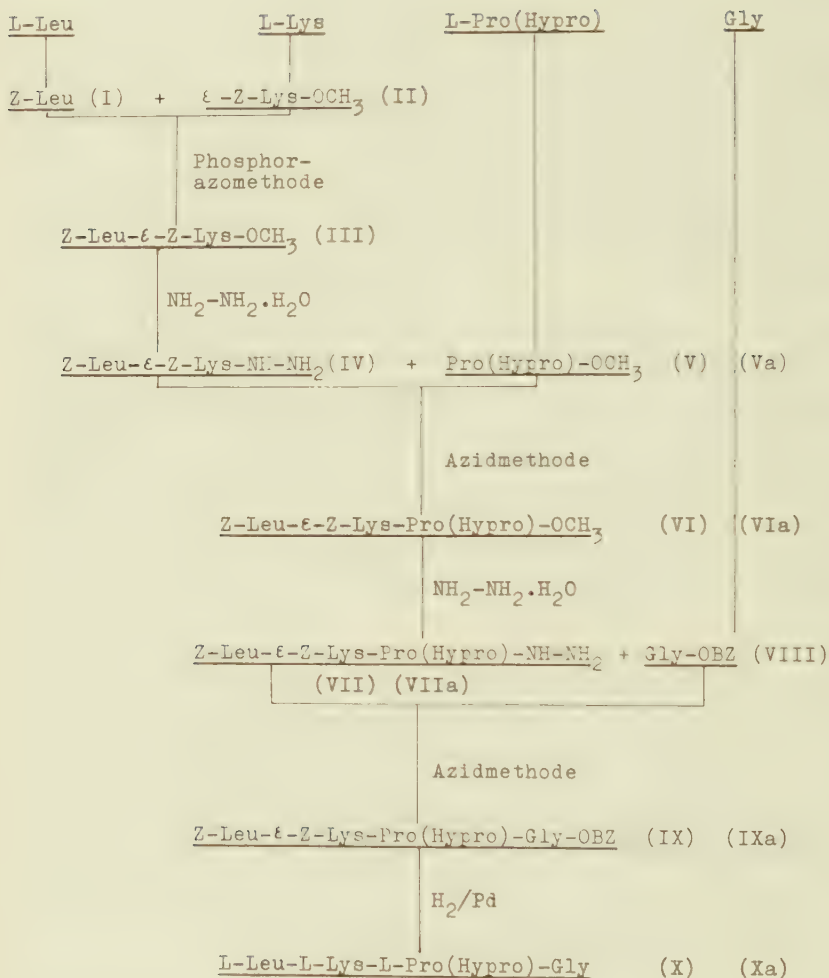
Dieser Weg wurde neuerdings auch von E a n n³⁵⁾ bei der Darstellung des Gly-L-Phe-L-Phe-L-Tyr beschritten. S c h w y z e r³⁶⁾ gelang es, die obengenannte Schwierigkeit zu umgehen, indem er nicht den Benzylester als Carboxylschutzgruppe in die Peptidsynthese einbezog, sondern den p-Nitro-benzylester. In diesem Falle ist die selektive Entfernung der Carbobenzoxyschutzgruppe mit HBr in Eisessig möglich.

Schema 1



Z = Carbobenzoxystoff

Schema 2

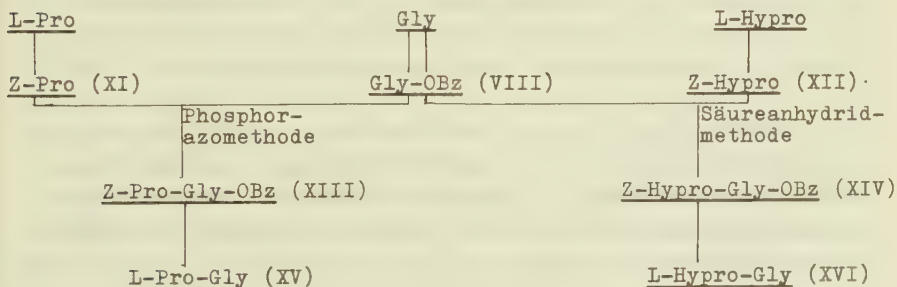


Für die Darstellung des Dipeptidderivates (III) wurde die Phosphorazomethode eingeplant, weil über diese Methode durch G r a ß m a n n und W ü n s c h³⁷⁾ reichliches Erfahrungsmaterial vorlag. In die weiteren Stufen konnte die Phosphorazomethode nicht mehr einbezogen werden, da sie für den Einbau des Hydroxyprolins nicht geeignet ist. Hierfür schien die Azidmethode besonders vorteilhaft zu sein. Mit ihrer Hilfe kann nicht nur, wie bei der Säureanhydridmethode und dem Carbodiimidverfahren, das Hydroxyprolin zu Peptiden verknüpft werden, sondern auch die Verseifung des Dicarbobenzoxo-tripeptid-esters (VI) (VIa), die bei der Anwendung der Säureanhydridmethode und dem Carbodiimidverfahren ebenfalls notwendig wäre, durch die Überführung in das Hydrazid umgangen werden.

4. Synthesenwege für die Darstellung der Vergleichssubstanzen

L-Pro-Gly, L-Hypro-Gly und L-Leu-L-Lys

Für die Darstellung der bereits beschriebenen Dipeptide L-Pro-Gly und L-Hypro-Gly schien auf Grund der obigen Ausführungen der Weg über die Carbobenzoxo-dipeptid-benzylester am vorteilhaftesten zu sein.



B e r g m a n n³⁸⁾ stellte das L-Hypro-Gly ebenfalls über den L-Hydroxyprolyl-glycin-benzylester dar. Er ging dabei vom Carbobenzoxo-L-hydroxyprolin aus, veresterte es mit Methylalkohol und führte den Ester in das Hydrazid über, das er dann mit Glycin-benzylester kuppelte. Dieser Weg wurde durch die Anwendung der Säureanhydridmethode vereinfacht. Hierbei wird das Carbobenzoxo-L-hydroxyprolin direkt in die Synthese eingesetzt, sodass dessen Veresterung und Hydrazidbildung entfallen.

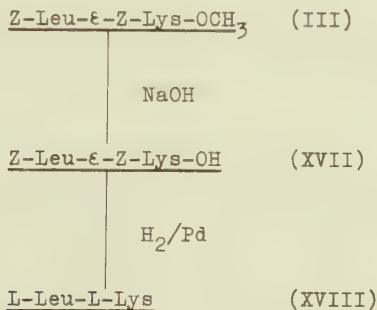
Die Darstellung des L-Pro-Gly wurde von A b d e r h a l d e n³⁹⁾, R y d o n⁴⁰⁾, G r a B m a n n und W ü n s c h³⁷⁾ beschrieben. A b d e r h a l d e n³⁹⁾ ging vom Carbobenzoxo-L-prolin aus, führte dieses in das Säurechlorid über und brachte es mit dem Natriumsalz des Glycins nach E. F i s c h e r zum Umsatz. Das so erhaltene Carbobenzoxo-L-prolyl-glycin war ölig und enthielt noch Glycin. Der Carbobenzoxorest wurde durch Hydrierung entfernt und das Reaktionsprodukt durch Umkristallisieren gereinigt.

R y d o n⁴⁰⁾ verbesserte die Darstellung des L-Pro-Gly, indem er an Stelle des Natriumsalzes des Glycins den Glycin-äthylester einsetzte. Der Carbobenzoxo-L-prolyl-glycin-äthylester war zwar auch ölig, die Verseifung mit NaOH führte aber zum kristallinen Carbobenzoxo-L-prolyl-glycin. Die katalytische Hydrierung lieferte wieder ein reines L-Prolyl-glycin.

G r a B m a n n und W ü n s c h³⁷⁾ stellten fast gleichzeitig das L-Prolyl-glycin auf demselben Wege dar, wählten zu dessen Synthese aber nicht die Säurechloridmethode, sondern die modernere Phosphorazomethode. Sie kamen zu den gleichen Ergebnissen wie Rydon.

Für die Darstellung des L-Pro-Gly in dieser Arbeit wurde schließlich der Weg über den Benzylester gewählt, weil hierbei die Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung gleichzeitig entfernt werden können.

Die Darstellung des L-Leu-L-Lys ergab sich aus der Verwendung des Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin-methylesters, der bei der Synthese der beiden Tetrapeptide als Zwischenprodukt auftritt.



5. Die Darstellung der Tetrapeptide L-Leu-Lys-L-Hydroxy-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly

a) L-Leucyl-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin

Carbobenzoxy-L-leucin⁴¹⁾ (I) wurde nach der Phosphorazomethode mit ϵ -Carbobenzoxy-L-lysin-methylester (II) zum Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin-methylester (III) umgesetzt. Dieses Produkt wurde in kristalliner und analytisch reiner Form erhalten. Die Ausbeute betrug 87 %. Die Überführung des Dicarbobenzoxy-dipeptid-esters in das Hydrazid gelang nach einer Vorschrift von B e r g m a n n⁴²⁾. Das kristalline und analytisch reine Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysylhydrazid (IV) konnte mit Hilfe der Azidmethode in 69 %-iger Ausbeute durch Kuppeln mit L-Hydroxy-prolin-methylester³⁸⁾ (Va) in den Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-lysyl-L-hydroxyprolin-methylester (VIa) übergeführt werden. Die Darstellung des entsprechenden Hydrazides stieß zunächst auf Schwierigkeiten. Der Dicarbobenzoxy-tripeptid-ester war wieder nach der

Vorschrift von B e r g m a n n⁴²⁾ in wenig Methanol gelöst, mit der dreifachen Menge Hydrazinhydrat versetzt und eine Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen worden. Bei Zusatz von Äther wurde entgegen der Erwartung nichts abgeschieden.

Derselbe Versuch wurde unter der Abänderung wiederholt, dass die Lösung mehrere Stunden auf dem Wasserbad erhitzt wurde. Nach Zugabe von Äther konnte festgestellt werden, dass wieder keine Reaktion eingetreten war. Erst nach zweistündigem Kochen mit dem zwölffachen Überschuß an Hydrazinhydrat fiel mit Äther, wie die Analysenwerte bestätigten, das gewünschte Produkt aus. Die erschwerte Hydrazidbildung des Carbobenzoxy-L-leucyl-E-carbobenzoxy-L-lysyl-L-hydroxyprolin-methylesters dürfte auf die sterische Hinderung des endständigen Hydroxy-prolin-methylesters zurückzuführen sein. Diese Annahme wurde durch Betrachtungen am Kalottenmodell bestätigt.

Eine ähnliche Erscheinung wurde von Z w i c k⁴³⁾ bei der Überführung des Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-valin-methylesters in das Hydrazid beschrieben. Dort führte erst der 15-fache Überschuß an Hydrazinhydrat und 90-minütiges Kochen zum Ziel. Z w i c k gibt als Ursache der erschwerten Hydrazidbildung ebenfalls die sterische Hinderung an.

Das kristalline Carbobenzoxy-L-leucyl-E-carbobenzoxy-L-lysyl-L-hydroxyprolin-hydrazid (VIIa) (Ausbeute 50 %) wurde schließlich mit dem Glycin-benzylester⁴⁴⁾ (VIII) mit der Azidmethode zum Carbobenzoxy-L-leucyl-E-carbobenzoxy-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin-benzylester (IXa) verknüpft; obwohl dieses Produkt als schaumiges Pulver anfiel, waren die Analysenergebnisse sehr gut. Das in 63 %-iger Ausbeute erhaltene Tetrapeptidderivat sollte durch katalytische Hydrierung unter Zusatz von einem Äquivalent HCl in das freie L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly-monohydrochlorid übergeführt werden. Die chromatographische Überprüfung des angefallenen Produktes zeigte aber erhebliche Verunreinigungen (Chromatogramm 1).

Es ist bekannt, daß der Carbobenzoxystoff, der am Leucin sitzt, bei der katalytischen Hydrierung schlecht abgespalten wird. Das verbliebene Carbobenzoxy-L-leucyl-L-lysyl-L-hydroxy-prolyl-glycin kann dann mit der Salzsäure, ebenso wie die anderen eventuellen ninhydrinpositiven Verunreinigungen und das gewünschte Tetrapeptid, ein Hydrochlorid bilden. Dadurch werden die Löslichkeitsverhältnisse sehr ähnlich und die präparative Trennung erschwert.

Um diese Erscheinung auszuschließen, wurde nicht HCl zugesetzt, sondern Essigsäure. Es wurde hierbei von der Überlegung ausgegangen, daß Diamino-monocarbonsäuren mit Eisessig, auch im Überschuß, Monoacetate bilden. Wird nun der Carbobenzoxystoff im Leucin des Tetrapeptidderivates nicht restlos abgespalten, so liegt dieser Teil der Substanz, das Carbobenzoxy-L-leucyl-L-lysyl-L-hydroxyprolyl-glycin, als Monoamino-carbonsäure vor, die kein Acetat bilden kann und wahrscheinlich wasserunlöslich ist. Es wurde daher die Abspaltung der Schutzgruppen mit katalytisch erregtem Wasserstoff unter Zusatz von überschüssigem Eisessig ausgeführt. Das erhaltene Produkt wurde in Wasser aufgenommen, die trübe Lösung filtriert und das Filtrat eingedampft. Es blieb das L-Leu-L-Lys-L-Hydro-Gly. CH_3COOH (Xa) in Form eines weissen, trockenen Pulvers zurück, das chromatographisch und analytisch rein war (Chromatogramm 1). Die quantitative Aminosäurebestimmung ergab, daß die Aminosäuren Leucin, Lysin, Hydroxyprolin und Glycin im Verhältnis 0,98 : 1,03 : 0,99 : 1,00 vorlagen.

b) L-leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin

Carbobenzoxy-L-leucyl-**E**-carbobenzoxy-L-lysin-hydrazid (IV) wurde nach der Azidmethode mit dem L-Prolin-methylester⁴⁵⁾ (V) zum Carbobenzoxy-L-leucyl-**f**-carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolin-methylester (VI) umgesetzt (Ausbeute 72 %). Dieses analytisch reine Produkt war wie der entsprechende Hydroxyprolin-methylester ein amorphes Pulver. Die Behandlung mit der 12-fachen Menge Hydrazinhydrat führte in 66 %-iger Ausbeute wieder zum kristallinen Carbobenzoxy-L-leucyl-**f**-carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolin-

hydrazid (VII). Dieses Derivat schied sich aus Methanol-Äther nur als Öl ab. In Methanol-Wasser konnte es aber zum Kristallisieren gebracht werden.

Der Umsatz des auch analytisch reinen Dicarbobenzoxo-tripeptidhydrazides mit Glycinbenzylester⁴⁴⁾ (VIII) zum kristallinen und analytisch reinen Carbobenzoxo-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxo-L-lysyl-L-prolyl-glycin-benzylester (IX) erfolgte ebenfalls wieder mit der Azidmethode. Durch katalytische Hydrierung in Anwesenheit von Eisessig konnte daraus das chromatographisch reine L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH_3COOH (X) (Chromatogramm 1), ein weißes Pulver, erhalten werden, das nach den Ergebnissen der Elementaranalyse und der quantitativen Aminosäurebestimmung nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 20°C noch zusätzliche zwei Moleküle Essigsäure festhielt; (eine ähnliche Beobachtung machte H o f - m a n n⁴⁶⁾ bei der Darstellung von Argininpeptiden). Das Aminosäureverhältnis von Leucin : Lysin : Prolin : Glycin wurde mit 0,95 : 0,97 : 1,03 : 1,05 gefunden.

6. Die Darstellung der Vergleichssubstanzen L-Pro-Gly, L-Hydroxypro-Gly und L-Leu-L-Lys

a) L-Prolyl-glycin und L-Hydroxyprolyl-glycin

Carbobenzoxo-L-prolin⁴⁷⁾ (XI) wurde nach der Phosphorazomethode, Carbobenzoxo-L-hydroxyprolin³⁴⁾ (XII) nach der Säureanhydridmethode mit Glycinbenzylester⁴⁴⁾ (VIII) zum Carbobenzoxo-L-prolyl-glycin-benzylester (XIII) und Carbobenzoxo-L-hydroxyprolyl-glycin-benzylester (XIV) umgesetzt. Die Ausbeuten betrugen 83% und 86%. Die kristallinen und analytisch reinen Carbobenzoxo-dipeptid-benzylester wurden durch katalytische Hydrierung in die freien, chromatographisch reinen Dipeptide L-Prolyl-glycin (XV) und L-Hydroxyprolyl-glycin (XVI) übergeführt (Chromatogramm 2).

b) L-Leucyl-L-lysin

Carbobenzoxo-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxo-L-lysin-methylester (III) wurde mit 2n NaOH zum Carbobenzoxo-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxo-L-lysin

(XVII) verseift (Ausbeute 82 %). Die Carbobenzoxyenschutzgruppen dieses kristallinen und analytisch reinen Dicarbobenzoxy-dipeptides wurden wieder durch katalytische Hydrierung unter Zusatz von Eisessig entfernt. Das entstandene L-Leu-L-Lys . CH_3COOH (XVIII) war analytisch und chromatographisch rein (Chromatogramm 2).



Chromatogramm 1

- 1: L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly . HCl
2: L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly . CH_3COOH
3: L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH_3COOH



Chromatogramm 2

- 1: L-Pro-Gly
2: L-Leu-L-Lys . CH_3COOH
3: L-Hypro-Gly

7. Experimenteller Teil

A. L-Leucyl-L-lysyl-L-hydroxypropyl-glycin . CH_3COOH

a) Carbobenzoxy-L-leucin (I)

26,23 g L-Leucin (2/10 Mol) wurden nach einer Vorschrift von B e r g m a n n⁴¹⁾ mit 30 ml Carbobenzoychlorid und 100 ml 2n NaOH acyliert. Das erhaltene Produkt war, wie in der Literatur beschrieben, ein zähes Öl.

Ausbeute: 47,2 g = 89 % d. Th.

b) ϵ -Carbobenzoxy-L-lysine-methylester (II)

ϵ -Carbobenzoxy-L-lysine⁴⁸⁾ 36,5 g L-Lysin . HCl (2/10 Mol) wurden in 300 ml Wasser gelöst und zum Sieden erhitzt. In die kochende Lösung wurde basisches Kupferkarbonat in geringem Überschuß portionsweise eingebracht. Es wurden 100 ml 2n NaOH zugefügt und die blaue Lösung in Eis gekühlt. 30 ml Carbobenzoychlorid und 100 ml 2n NaOH wurden innerhalb einer Stunde bei p_{H} 8,8 - 9 unter kräftigem Rühren zugesetzt. Der Kupferkomplex wurde als blauer Niederschlag abgeschieden. Nach dem Abfiltrieren war das Filtrat farblos. Der Kupferkomplex wurde mit Wasser und Äthanol gewaschen und in 2 Liter Wasser suspendiert. Nach Zusatz von 200 ml nHCl wurde bei 40-50° C unter Rühren Schwefelwasserstoff eingeleitet.

Die Lösung wurde nach etwa 3 Stunden zum Sieden erhitzt und vom abgeschiedenen Kupfersulfid abfiltriert. Das Filtrat wurde schwach ammoniakalisch gemacht, wobei sich das ϵ -Carbobenzoxy-L-lysine als dicker weißer Brei abschied. Nach Kühlung im Eisschrank wurde abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Das Produkt wurde aus viel Wasser umkristallisiert. Die benötigte Wassermenge betrug etwa 6 Liter. $F_p = 236-238^\circ \text{C}$ unter Zersetzung (Literatur^{49,50)} = 238° C).

Ausbeute: 35,3 g = 63 % d. Th.

ε-Carbobenzoxyl-L-lysin-methylester . HCl 28,03 g ε-Carbobenzoxyl-L-lysin (1/10 Mol) wurden, in Anlehnung an eine Vorschrift von S y n g e⁵¹⁾ für die Veresterung von ε-Carbobenzoxyl-L-ornithin, in 200 ml 1n methanolischer Salzsäure gelöst und bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wurde bei 30°C im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde dreimal in 100 ml abs. Methanol aufgenommen und wieder eingedampft. Die Veresterung wurde dreimal durchgeführt. Nach der dritten Veresterung, manchmal auch schon nach der zweiten, blieb ein kristallines Rohprodukt zurück. Es wurde mit heißem Aceton behandelt und vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Beim langsamen Abkühlen schied sich das ε-Carbobenzoxyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid asbestartig ab. Durch Umkristallisieren aus Chloroform/Äther wurde es in Form feiner Nadeln erhalten. $F_p = 117^{\circ}\text{C}$ (Lit.^{42,49)} 117°C).

Ausbeute: 24,5 g = 74 % d. Th.

Analyse:

	C ₁₅	H ₂₃	N ₂	O ₄	Cl	330,807
			C	H	N	Cl
ber.	54,46	7,01	8,47	10,72		
gef.	54,89	6,75	8,39	10,69		

c) Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysin-methylester (III)

In eine Lösung von 16,5 g ε-Carbobenzoxyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid (1/20 Mol) in Pyridin wurden bei - 5°C 2,18 ml PCl₃ eingebracht. Nach Erreichung der Zimmertemperatur wurden 13,75 g Carbobenzoxyl-L-leucin -gelöst in Pyridin- zugegeben und 3 Std. auf dem Wasserbad erhitzt. Das Pyridin wurde bei 50°C im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit verdünnter Salzsäure und Essigester überschichtet und gut durchgeschüttelt.

Die Essigesterphase wurde mit Wasser neutralgewaschen, mit Kaliumbikarbonat ausgeschüttelt, wieder mit Wasser neutralgewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen im Vakuum bei 30°C blieb ein öliges Produkt zurück, das im Exsiccator über Phosphorpentoxyd kristallisierte. Es wurde aus Essigester/Petrol-äther umkristallisiert. $F_p = 96-97^{\circ}\text{C}$.

Ausbeute: 23,6 g = 87 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = - 11^{\circ} \pm 0,5 \quad (c = 2; \text{Eisessig})$$

Analyse: C₂₉ H₃₉ N₃ O₇ 541,626

	C	H	N
ber.	64,30	7,26	7,76
gef.	64,43	7,16	7,71

d) Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysin-hydrazid (IV)

18,05 g Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysin-methylester (1/30 Mol) wurden in 30 ml Methanol gelöst, zum Sieden erhitzt, mit 5 ml Hydrazinhydrat (1/10 Mol) versetzt und bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen.

Die gallertartig erstarrte Lösung wurde abgenutscht, der Rückstand in heißem Methanol gelöst und mit Äther versetzt. Das Hydrazid schied sich kristallin ab. Es wurde nochmals auf dieselbe Weise umkristallisiert. Fp = 178 - 179°C.

Ausbeute: 14,1 g = 78 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = - 18,3^{\circ} \pm 0,5 \quad (c = 2; \text{Eisessig})$$

Analyse: C₂₈ H₃₉ N₅ O₆ 541,632

	C	H	N
ber.	62,09	7,26	12,93
gef.	61,91	7,19	12,68

e) L-Hydroxyprolin-methylester . HCl (Va)

Nach der Vorschrift von B e r g m a n n³⁸⁾ wurden 13,11 g L-Hydroxyprolin (1/10 Mol) verestert.

Ausbeute: 14,9 g = 82 % d. Th.

f) Carbobenzoxyl-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysyl-L-hydroxyprolin-methylester (VIa)

10,83 g Carbobenzoxyl-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysin-hydrazid (1/50 Mol) wurden in 36 ml Eisessig und 12 ml Wasser gelöst, auf -5°C abgekühlt und mit 10 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Zu dieser Lösung wurden 1,4 g Natriumnitrit -gelöst in wenig Wasser- unter Schütteln zugetropft. Das gebildete Azid, das sich als Öl abschied, wurde mit kaltem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde mit kalter, gesättigter Bikarbonatlösung säurefrei gewaschen, anschließend mit eiskaltem Wasser bis zur Neutralreaktion behandelt und 15 Min. unter Kühlung mit Natriumsulfat getrocknet.

In der Zwischenzeit wurden 7,26 g L-Hydroxyprolin-methylesterhydrochlorid unter Zufügung von 5,56 ml Triäthylamin in kaltem Chloroform gelöst.

Beide Lösungen wurden vereinigt und 40 Std. bei $3 - 5^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum bei 30°C wurde der Rückstand zwischen Essigester und verdünnter Salzsäure verteilt und, wie bei der Darstellung des Carbobenzoxyl-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysin-methylesters bereits beschrieben, aufgearbeitet.

Es blieb ein festes, schaumiges Produkt zurück, das nicht zum Kristallisieren gebracht werden konnte.

Ausbeute: 9 g = 69 % d. Th.

Analyse: $\text{C}_{34} \text{H}_{46} \text{N}_4 \text{O}_9$ 654,740

	C	H	N
ber.	62,37	7,08	8,56
gef.	62,53	7,23	9,04

g) Carbobenzoxyl-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysyl-L-hydroxyprolin-hydrazid (VIIa)

4,6 g Carbobenzoxyl-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysyl-L-hydroxyprolin-methylester (7/1000 Mol) wurden in 10 ml Methanol gelöst, mit 4,2 ml Hydrazinhydrat (84/1000 Mol) versetzt und 2 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Beim Eindampfen der Lösung im Vakuum bei 30° C blieb ein festes Produkt zurück. Es wurde in heißem Methanol gelöst, mit Äther ausgefällt und auf dieselbe Weise nochmals umkristallisiert. $T_p = 202 - 203^\circ \text{C}$.

Ausbeute: 2,3 g = 50 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = -35,8^\circ \pm 0,5 \quad (c = 2; \text{Eisessig})$$

Analyse: C₃₃ H₄₆ N₆ O₈ 654,746

	C	H	N
ber.	60,53	7,08	12,84
gef.	60,41	7,16	12,73

h) Glycin-benzylester . HCl (VIII)

15 g Glycin (2/10 Mol) wurden nach F ü r s t ⁴⁴⁾ mit Benzyl-
alkohol in Gegenwart von HCl verestert und das so erhaltene
Ester-hydrochlorid über den freien Ester gereinigt.

Ausbeute: 15,1 g = 75 % d. Th.

1) Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysyl-L-hydroxypropyl-glycin-benzylester (IXa)

2 g Carbobenzoxy-L-leucyl-t-carobenzoxy-L-lysyl-L-tyrosylprolinhydrazid (3/1000 Mol) wurden in 15 ml Eisessig und 15 ml Wasser gelöst, auf -5°C abgekühlt und mit 2 ml konzentrierter Salzsäure versetzt.

Zu dieser Lösung wurden 0,5 g Natriumnitrit - gelöst in wenig Wasser - unter Schütteln zusetzt. Das gebildete Azid, das sich als Öl abschied, wurde mit kaltem Äther aufgenommen. Die Ätherphase wurde wie unter f) beschrieben weiterbehandelt.

Mittlerweile wurden 1,21 g Glycin-Benzylester . HCl (6,1000 Mol) unter Zusatz von 0,35 ml Triäthylamin in kaltem Chloroform gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und 40 Stunden bei 3-5°C gehalten. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum bei 30°C wurde der Rückstand zwischen Essigester und verdünnter Salzsäure verteilt und wie üblich aufgearbeitet.

Es blieb ein festes, schaumartiges Produkt zurück, das aus Essigester/Petroläther als Öl abgeschieden wurde. Beim Trocknen im Exsiccator fiel es wieder amorph an.

Ausbeute: 1,5 g = 63 % d. Th.

Analyse: C₄₂ H₅₃ N₅ O₁₀ 787,884
 C H N
 ber. 64,02 6,78 8,89
 gef. 64,14 6,80 8,92

k) L-Leucyl-L-lysyl-L-hydroxypropyl-glycin . CH₃COOH (Xa)

200 mg Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-hydroxypropyl-glycin-benzylester wurden in wässrigem Dioxan gelöst und mit 2 ml Eisessig versetzt. In diese Lösung wurde in Anwesenheit von Palladiummohr 6 Stunden Wasserstoff eingeleitet. Das Palladium wurde durch Filtrieren abgetrennt, das Filtrat bei 30° C im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit kaltem Wasser behandelt. Die trübe Lösung wurde wieder filtriert und das Wasser durch Vakuumdestillation entfernt.

Das erhaltene glasige Produkt wurde in Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von Äther und Aceton blieb nach Entfernung des Lösungsmittelgemisches ein weißes Pulver zurück.

Die Analyse ergab bei einer Einwaage von 4,450 mg einen nicht verbrennbaren Anteil von 0,88 mg = 2,14 %, der vom Salzgehalt des destillierten Wassers herrühren dürfte. Bei der Aufarbeitung des L-Leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin . CH₃COOH wurde deshalb bidestilliertes Wasser verwendet. Dort trat kein Rückstand auf.

Ausbeute: 84 mg = 68 % d. Th.

Analyse: C₂₁ H₃₉ N₅ O₈ 489,562
 C H N
 ber. 51,52 8,03 14,31
 gef. 51,51 7,99 14,35
 (Unter Berücksichtigung des Rückstandes)

Quantitative Aminosäurebestimmung

<u>Einwaage:</u>	0,858 mg	= 1,752 μ Mol	= 100 %	Verhältnis
<u>Gefunden:</u>	Glycin	= 1,785 "		0,98
	Leucin	= 1,875 "		: 1,03
	Hydroxyprolin	= 1,795 "		: 0,99
	Lysin	= 1,825 "		: 1,00
	Mittelwert	= 1,820 μ Mol	= 103,9 %	

B. L-Leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin . CH_3COOH

a) L-Prolin-methylester . HCl (V)

11,5 g L-Prolin (1/10 Mol) wurden nach einer Vorschrift von H a c k e r⁴⁵⁾ mit 7,9 ml Thionylchlorid in absolutem Methanol verestert.

Ausbeute: 15,2 g = 95 % d. Th.

b) Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolin-methylester (VI)

5,41 g Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin-hydrazid (1/100 Mol) wurden in 36 ml Eisessig und 12 ml Wasser gelöst, auf - 5° C gebracht und mit 5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Zur Überföhrung in das Azid wurde eine wässrige Lösung von 0,7 g Natriumnitrit unter Schütteln zuge tropft. Das ausgeschiedene Öl wurde mit kaltem Äther ausgeschüttelt und die Ätherphase wie unter A,f aufgearbeitet. Sie wurde mit der kalten Esterlösung - bereitet aus 3,32 g L-Prolin-methylester . HCl und 2,78 ml Triäthylamin in Chloroform - vereinigt und 40 Stunden bei 3 - 5° C stehen gelassen.

Die Aufarbeitung erfolgte wieder nach A,f.

Es wurde ein gelatineartiges Produkt erhalten, das nicht zum Kristallisieren gebracht werden konnte.

Ausbeute: 4,6 g = 72 % d. Th.

<u>Analyse:</u>	C ₃₄	H ₄₆	N ₄	O ₈	638,740
	C	H	N		
	ber. 63,93	7,26	8,77		
	gef. 64,21	7,44	8,80		

c) Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolin-hydrazid (VII)

3,2 g Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolin-methylester (1/200 Mol) wurden mit 3 ml Hydrazinhydrat (12/200 Mol) in 10 ml Methanol 2 Stunden unter Rückfluß auf dem Wasserbad erhitzt.

Nach Zugabe von Äther schied sich ein Öl ab, das aus Methanol/Wasser kristallisierte. Fp = 148° C

Ausbeute: 2,1 g = 66 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = -47^{\circ} \pm 0,5 \quad (c \approx 2; \text{Eisessig})$$

Analyse: C₃₃ H₄₆ N₆ O₇ 638,746

	C	H	N
ber.	62,05	7,26	13,16
gef.	62,39	7,25	12,78

d) Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolyl-glycinbenzylester (IX)

1,28 g Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-prolin-hydrazid (2/1000 Mol) wurden in 15 ml Wasser und 15 ml Eisessig gelöst. Nach Kühlung der Lösung auf - 5° C wurde eine wässrige Lösung von 0,14 g Natriumnitrit zugetropft und das ausgeschiedene Azid in kaltem Äther aufgenommen.

Die Ätherphase wurde wieder wie bei A,f beschrieben weiterbehandelt. Der Umsatz mit dem Glycin-benzylester - bereitet aus 0,8 g Glycin-benzylester . HCl (A,h) und 0,6 ml Triäthylamin in Chloroform - erfolgte wieder bei 3 - 5° C innerhalb von 40 Stunden.

Aufarbeitung wie A,f.

Es blieb ein gelatineartiges Produkt zurück, das aus Essigester/Petroläther auskristallisierte. Fp = 104 - 105° C.

Ausbeute: 1 g = 68 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = -65,5 \pm 0,5 \quad (c = 2; \text{Methanol})$$

Analyse: C₄₂ H₅₃ N₅ O₉ 771,884

	C	H	N
ber.	65,35	6,92	9,07

gef.	65,02	6,89	8,70
------	-------	------	------

e) L-Leucyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin . CH₃COOH

250 mg Carbobenzoxyl-L-leucyl-ε-carbobenzoxyl-L-lysyl-L-prolyl-glycin-benzylester wurden in wenig wässrigem Dioxan gelöst, mit 2 ml Eisessig versetzt und wieder, wie unter A,k beschrieben, mit katalytisch erregtem Wasserstoff behandelt.

Nach Entfernung des Katalysators und des Lösungsmittels wurde der Rückstand in wenig kaltem, bidestilliertem Wasser aufgenommen, die trübe Lösung filtriert und das Filtrat bei 30° C im Vakuum unter Zusatz von Dioxan eingedampft. Das L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH₃COOH blieb in Form eines weißen Pulvers zurück, das nach den Ergebnissen der Elementaranalyse und der quantitativen Aminosäurebestimmung noch 2 Moleküle Essigsäure enthielt.

Ausbeute: 139 mg = 72 % d. Th.

Analyse: [L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH₃COOH] . 2 CH₃COOH

C₂₅ H₄₇ N₅ O₁₁ 593,666

	C	H	N
ber.	50,57	7,98	11,80

gef.	50,23	7,98	11,78
------	-------	------	-------

Quantitative Aminosäurebestimmung:

Einwaage: 0,404 mg = 0,681 Mol = 100 %

Verhältnis

<u>Gefunden:</u>	Glycin	= 0,637	"	0,95
	Leucin	= 0,654	"	: 0,97
	Prolin	= 0,699	"	: 1,03
	<u>Lysin</u>	= 0,719	"	: 1,05

Mittelwert = 0,677 Mol = 99,4 %

C. L-Prolyl-glycin

a) Carbobenzoxo-L-prolin (XI)

11,5 g L-Prolin (1/10 Mol) wurden nach der Vorschrift von G r a ß m a n n und W ü n s c h⁴⁷⁾ carbobenzoxyliert.

Ausbeute: 22,5 g = 90 % d. Th.

b) Carbobenzoxo-L-prolyl-glycin-benzylester (XIII)

Zu einer Lösung aus 20,17 g Glycin-benzylester . HCl (A,h) und 200 ml Pyridin wurden unter Eiskühlung und Rühren 6,87 ml Phosphortrichlorid - gelöst in 25 ml Pyridin - zugeotropft. Nach kurzem Stehen bei Zimmertemperatur wurden 24,9 g Carbobenzoxo-L-prolin auf einmal in die Pyridinlösung eingebracht. Nach dreistündigem Erhitzen auf dem Wasserbad wurde das Pyridin bei 40 - 50° C im Vakuum entfernt.

Die Aufarbeitung des Rückstandes erfolgte wie bei A,c. Es blieb ein öliges Produkt zurück, das im Exsiccator über Phosphorpentoxyd erstarrte und aus Essigester/Petroläther kristallin anfiel. Fp = 87° C.

Ausbeute: 33 g = 83 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = -62^{\circ} \pm 0,5 \text{ (c = 2; Methanol)}$$

Analyse: C₂₂ H₂₄ N₂ O₅

	C	H	N
ber.	66,65	6,10	7,07
gef.	66,29	6,32	7,22

c) L-Prolyl-glycin (XV)

1,9 g Carbobenzoxy-L-prolyl-glycin-benzylester (3/1000 Mol) wurden in wässrigem Dioxan gelöst, mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt und in Gegenwart von Palladiummohr mit Wasserstoff behandelt.

Nach dem Abfiltrieren des Katalysators und der Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in wenig heißem Wasser aufgenommen. Bei Zusatz von Alkohol fielen die Kristalle in Stäbchenform aus.

Ausbeute: 0,5 g = 92 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{19} = -22,5^\circ \pm 0,5 \quad (c = 2; H_2O)$$

Dieser Drehwert stimmte mit dem von G r a s m a n n und W ü n s c h ³⁷⁾ angegebenen überein.

D. L-Hydroxyprolyl-glycin

a) Carbobenzoxy-L-hydroxyprolin (XII)

6,6 g L-Hydroxyprolin (1/20 Mol) wurden nach W ü n s c h ³⁴⁾ carbobenzoxyliert.

Ausbeute: 10,9 g = 82 % d. Th.

b) Carbobenzoxy-L-hydroxyprolyl-glycin-benzylester (XIV)

2,65 g Carbobenzoxy-L-hydroxyprolin (1/100 Mol) wurden in Tetrahydrofuran/Dioxan (3 : 2) gelöst, mit 1,4 ml Triäthylamin versetzt, auf 10° C abgekühlt und nach Zugabe von 0,96 ml Chlorameisensäure-äthylester 10 Minuten stehen gelassen.

In der Zwischenzeit wurden 2 g Glycin-benzylester . HCl (A,h) in Dioxan und 1,4 ml Triäthylamin gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und nach 5 Minuten zum Sieden erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Kaliumbikarbonat versetzt.

Das organische Lösungsmittel wurde größtenteils im Vakuum bei 30° C entfernt und der Rückstand mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wurde zunächst mit Wasser neutralgewaschen, dann mit verdünnter Salzsäure behandelt, wieder neutralgewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nach dem Eindampfen im Vakuum bei 30° C wurde das Produkt in Form von Nadeln erhalten. Es wurde aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Fp = 153° C (Lit.³⁸⁾ 153° C).

Ausbeute: 3,5 g = 86 % d. Th.

c) L-Hydroxypropyl-glycin (XVI)

1,2 g Carbobenzoxy-L-hydroxypropyl-glycin-benzylester (3/1000 Mol) wurden in wässrigem Dioxan gelöst und unter Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure in Anwesenheit von Palladiumschwarz Wasserstoff durchgeleitet.

Die Aufarbeitung erfolgte wieder nach C,c.

Aus heißem Wasser/Alkohol wurde das L-Hydroxypropyl-glycin nadelförmig abgeschieden.

Ausbeute: 0,5 g = 88 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = -15,1^\circ \pm 0,5 \text{ (c = 2; H}_2\text{O)} \text{ (Lit. }^{34}) - 15,5^\circ \pm 0,5)$$

E. L-Leucyl-L-lysin . CH₃COOH

a) Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysin (XVII)

1,1 g Carbobenzoxy-L-leucyl-ε-carbobenzoxy-L-lysin-methylester (A,c) (2/1000 Mol) wurden bei Zimmertemperatur in wässrigem Methanol mit 1ml 2n NaOH verseift.

Die Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert und im Vakuum bei 30° C eingedampft. Der Rückstand wurde zwischen Essigester und verdünnter Salzsäure verteilt, die Essigesterphase mit

Wasser neutralgewaschen und das Reaktionsprodukt mit Kaliumbikarbonatlösung extrahiert. Nach dem Ansäuern der Lösung mit verdünnter Salzsäure wurde das ausgeschiedene Öl wieder in Essigester aufgenommen, die Essigesterphase mit Wasser neutralgewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nach dem Eindampfen blieb ein Öl zurück. Aus Essigester/Petroläther schied sich das Produkt kristallin ab. $F_p = 83 - 98^\circ \text{C}$ unter Sintern.

Ausbeute: 0,8 g = 72 % d. Th.

Analyse: $\text{C}_{28} \text{H}_{37} \text{N}_3 \text{O}_7$ 527,600

	C	H	N
ber.	63,74	7,07	7,97
gef.	64,15	6,91	7,86

b) L-Leucyl-L-lysin . CH_3COOH (XVIII)

100 mg Carbobenzoxyl-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxyl-L-lysin wurden in wässrigem Dioxan unter Zusatz von 1 ml Eisessig und Palladiumschwarz mit Wasserstoff behandelt und wie unter B,e aufgearbeitet. Es blieb ein weißes amorphes Pulver zurück.

Ausbeute: 48 mg = 78 % d. Th.

Analyse: $\text{C}_{14} \text{H}_{29} \text{N}_3 \text{O}_5$ 319,396

	C	H	N
ber.	52,64	9,15	13,16
gef.	53,10	9,18	13,45

V. Enzymchemischer Teil

In diesem Teil der Arbeit wurde nun das Verhalten der Lys-Pro- und der Lys-Hypro Bindung in den synthetisierten Tetrapeptiden L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly gegenüber Trypsin untersucht.

Entsprechend den Versuchsbedingungen bei tryptischen Abbauten wurden diese Spaltversuche mit einem Verhältnis von Enzym zu Substrat 1:100 bei 37°C und p_H 8,2 durchgeführt. Für die Erfassung eines geringen Spaltungsgrades war es günstig, diese Abbauversuche über 24 Stunden zu erstrecken. Die Auswertung dieser Versuche sollte papierchromatographisch so erfolgen, dass, aus den bereits in der Aufgabenstellung erwähnten Gründen, der eventuelle Spaltungsgrad dieser tertiären Amidbindungen mit Hilfe der Vergleichssubstanzen L-Leu-L-Lys, L-Hypro-Gly und L-Pro-Gly bis zu 1 % zu erfassen war.

Dies war nur im Falle der Lys-Hypro Bindung zu erreichen. Hier konnten die eventuell zu erwartenden Bruchstücke L-Leu-L-Lys und L-Hypro-Gly vom zugehörigen Tetrapeptid in Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser voneinander getrennt werden. Das L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly zeigte dagegen in mehreren Lösungsmitteln nur gegenüber dem L-Pro-Gly einen anderen R_f Wert. Gerade das L-Leu-L-Lys war aber für die Erfassung eines so geringen Spaltungsgrades wichtig. Während nämlich L-Leu-L-Lys bereits bei 1 Gamma eine deutliche Anfärbung mit Ninhydrin zeigt, benötigt man für das L-Pro-Gly 5 Gamma und für das L-Hypro-Gly sogar 10 Gamma. Dieser Unterschied erklärt sich einerseits aus der bekannt schlechteren Anfärbung der Prolinpeptide mit Ninhydrin und andererseits durch die zusätzliche Aminogruppe des L-Leu-L-Lys. Auf die besonders schlechte Anfärbbarkeit des L-Hypro-Gly weist schon W ü n s c h³⁴⁾ hin.

Die Trennbarkeit des L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly vom L-Leu-L-Lys dürfte auf die polare OH-Gruppe des Hydroxyprolins zurückzuführen sein. Diese bewirkt eine grössere Affinität zur stationären wässrigen Phase. Dadurch bleibt das Tetrapeptid hinter dem Dipeptid zurück. Beim L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly fehlt dieser Einfluss, seine Wanderungsgeschwindigkeit ist mit der des L-Leu-L-Lys gleich.

Aus den Mindestmengen der aufzutragenden Vergleichssubstanzen ergaben sich die den Versuchsansätzen zu entnehmenden Mengen der Abbauproben. Diese lagen nur für das L-Leu-L-Lys als Bezugssubstanz im Bereich der papierchromatographischen Methode.

Da das L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly und das L-Leu-L-Lys in allen getesteten Lösungsmitteln den gleichen R_f Wert besitzen, war auf diese Weise nur die Spaltbarkeit der Lys-Hydro Bindung im L-Leu-L-Lys-L-Hydro-Gly bis zu 1% erfassbar, wobei 1 Gamma L-Leu-L-Lys 200 Gamma des Tetrapeptides entsprechen. Die Spaltung der Lys-Pro Bindung im L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly konnte bei einer Auftragsmenge von 300 Gamma mit Hilfe des L-Pro-Gly dagegen nur bis zu 6% erfasst werden.

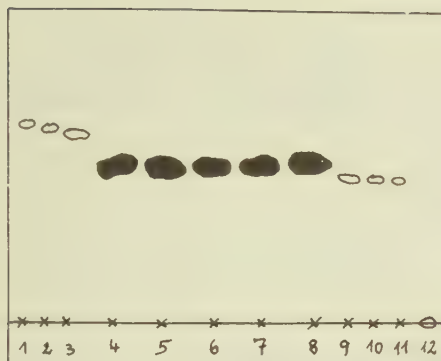
Eine Möglichkeit, die Spaltbarkeit der Lys-Pro Bindung ebenfalls bis zu 1% zu erfassen, bestand in der Methode der alkalimetrischen Mikrotitration nach G r a ß m a n n und H e y d e⁵²⁾. Das Prinzip dieser Methode, deren Fehlergrenze sich bei $\pm 1\%$ beläuft, beruht auf der Titration der Carboxylgruppen, die bei der enzymatischen Spaltung neu auftreten, mit $n/100$ KOH in alkoholischer Lösung.

Ergebnis der Spaltversuche

Die papierchromatographische Auswertung der Spaltversuche ergab beim L-Leu-L-Lys-L-Hydro-Gly sowohl für das Enzymverhältnis 1:100 wie 1:20 (fünffache Menge Trypsin), dass innerhalb der Fehlergrenze von 1% keine Spaltung der Lys-Hydro Bindung eintrat (Chromatogramme 3 und 4).

Auch die papierchromatographische Auswertung des Spaltversuches beim L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly (1:20) ergab keine Spaltung der Lys-Pro Bindung (Chromatogramm 5).

Mit Rücksicht auf die in diesem Falle größere Fehlergrenze (6%, s.o.), wurde die Spaltbarkeit der Lys-Pro Bindung alkalimetrisch nach G r a ß m a n n und H e y d e (Fehlergrenze 1%) verfolgt. Hierbei war ebenfalls keine Spaltung nachzuweisen.



Chromatogramm 3

Spaltversuch mit Trypsin
an L-Leu-L-Lys-L-Hypro
Gly . CH₃COOH 1:100

Lösungsmittel:

Butanol-Pyridin-Eisessig-H₂O
 4 4 1 5

Beschriftung:

1-3: L-Leu-L-Lys (1,2 und 3 Gamma)

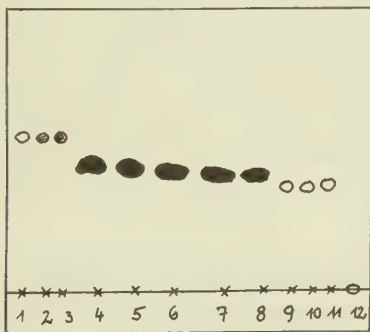
4-5: Abbauprobe nach 2 und 4 Stunden (200 Gamma)

6: Testsubstanz L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly . CH₃COOH . (200 Gamma)

7-8: Abbauprobe nach 8 und 24 Stunden (200 Gamma)

9-11: L-Hypro-Gly (30, 20 und 10 Gamma)

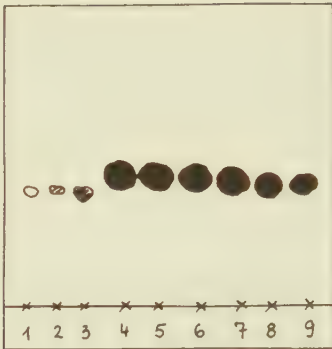
12: Trypsin (10 Gamma)



Chromatogramm 4

Spaltversuch mit Trypsin
an L-Leu-L-Lys-L-Hypro
Gly . CH₃COOH 1:20

Lösungsmittel und Be-
 schriftung wie oben.



Chromatogramm 5

Spaltversuch mit Trypsin an
[L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH₃COOH]
2 CH₃COOH 1:20

Lösungsmittel:

Butanol-Pyridin-Eisessig-H₂O
4 4 1 5

Beschriftung:

1-3: L-Pro-Gly (5, 10 und 15 Gamma)

4-6: Abbauproben nach 2, 4 und 8 Stunden (300 Gamma)

7: Testsubstanz [L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH₃COOH]. 2CH₃COOH (300 Gamma)

8: Abbauprobe nach 24 Stunden (300 Gamma)

9: L-Leu-L-Lys

Experimenteller Teil

1. Durchführung der tryptischen Spaltversuche an L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly . CH₃COOH 1:100 und 1:20

10 mg L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly . CH₃COOH wurden in 1 ml Wasser gelöst, mit 0,1 mg Trypsin versetzt und bei 37°C mit n/10 NaOH auf p_H 8,2 gebracht. Die Versuchsdauer betrug 24 Stunden. Der p_H blieb dabei konstant. Nach 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden dem Versuchsansatz jeweils 2/100 ml, das entspricht 200 Gamma des Tetrapeptides, entnommen und auf einen breiten Papierchromatographiebogen aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen wurden vom Tetrapeptid 200 Gamma, vom L-Leu-L-Lys 1, 2 und 3 Gamma und vom L-Hypro-Gly 10, 20 und 30 Gamma aufgebracht. Es wurde aufsteigend in Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (=4:4:1:5) chromatographiert. Die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin (Chromatogramm 3).

Die Durchführung des Spaltversuches 1:20 erfolgte auf die gleiche Weise (Chromatogramm 4).

2. Durchführung der tryptischen Spaltversuche an [L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH₃COOH] . 2CH₃COOH 1:20

a. Für die papierchromatographische Auswertung

10 mg [L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly . CH₃COOH] . 2CH₃COOH wurden wieder in 1 ml Wasser gelöst und mit 0,1 mg Trypsin bei 37°C und p_H 8,2 inkubiert. Der p_H blieb auch bei diesem Versuch konstant.

Die papierchromatographische Auswertung erfolgte wie unter 1., nur dass hier jeweils Proben zu 3/100 ml entnommen wurden und als Vergleichssubstanzen das Tetrapeptid zu 300 Gamma, das L-Pro-Gly zu 5, 10 und 15 Gamma und das L-Leu-L-Lys in einer nicht genau festgelegten Menge auf den Chromatographiebogen aufgetragen wurden (Chromatogramm 5).

b. Für die alkalimetrische Mikrotitration nach G r a ß m a n n
und H e y d e ⁵²⁾

In ein 1 ml Kölbchen wurden 11,87 mg [L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly
. CH_3COOH]. 2 CH_3COOH gegeben, mit 0,4 ml Trispuffer (p_H 8,2)
und 0,6 mg Trypsin - gelöst in 0,4 ml Wasser - versetzt und
auf Volumen gebracht.

Noch vor dem Erwärmen auf 37°C im Thermostaten wurde eine
Probe von 0,2 ml entnommen, mit 2 Tropfen 0,1%-iger Thymol-
phthaleinlösung versetzt und n/100 KOH bis zum Farbumschlag
aus einer auf 1/100 ml geeichten Bürette zugegeben. Es wurden
dann 0,9 ml heißer abs. Alkohol zugesetzt, wobei die Farbe
verschwand. Es wurde wieder bis zum Umschlagspunkt titriert.
Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von wiederum 0,9 ml heißen
Alkohols wiederholt und nun der genaue Endwert in der Weise
bestimmt, daß die zur Erreichung eines Farbtönen, welcher der
einer 0,0025 m ammoniakalischen CuCl_2 -Lösung entspricht,
zuzugebende Menge n/100 KOH einer auf 1/1000 ml geeichten
Mikrobürette entnommen wurde.

Die Titration wurde in gleicher Weise für die bei 4, 8 und
24 Stunden entnommenen Abbauproben durchgeführt.

Verbrauch n/100 KOH-Mengen

Probe 1 (Zeit 0)	: 1,917 ml
Probe 2 (nach 4 Stunden)	: 1,912 ml
Probe 3 (nach 8 Stunden)	: 1,921 ml
Probe 4 (nach 24 Stunden)	: 1,916 ml

Einer 100%-igen Spaltung der Lys-Pro Bindung würde ein Zuwachs
von 0,4 ml n/100 KOH entsprochen haben.

Zusammenfassung

Die Tetrapeptide L-Leu-L-Lys-L-Hypro-Gly und L-Leu-L-Lys-L-Pro-Gly wurden als Acetate nach Schema 2 (Seite 16) in analytisch und chromatographisch reiner Form dargestellt.

Die bereits beschriebenen Dipeptide L-Hypro-Gly und L-Pro-Gly wurden nach einer anderen Methode bzw. auf einem anderen Wege synthetisiert.

Das Dipeptid L-Leu-L-Lys. CH_3COOH wurde durch Verseifung des Carbobenzoxy-L-leucyl- ϵ -carbobenzoxy-L-lysin-methylesters und anschliessende katalytische Hydrierung in analytisch und chromatographisch reiner Form erhalten.

Die Spaltversuche mit Trypsin ergaben, dass die Lys-Pro Bindung und die Lys-Hypro Bindung in den synthetisierten Tetrapeptiden nicht gespalten wurden.

L i t e r a t u r

1. Hofmann, K. und Bergmann, M., J. Biol. Chem. 130, 81 (1939)
2. Bergmann, M., Fruton, J. S. und Pollok, H., Science 85, 410 (1937)
3. Hofmann, K. und Bergmann, M., J. Biol. Chem. 138, 243 (1941)
4. Van Orden, H. O. und Smith, E. L., J. Biol. Chem. 208, 751 (1954)
5. Schwert, G.W., Neurath, H., Kaufman, S. und Snoke, J.E., J. Biol. Chem. 172, 221 (1948)
6. Plentl, A. A. und Page, J. H., Biol. Chem. 163, 49 (1946)
7. Riedel, A., Wunsch, E. und Hartl, A., Z. Physiol. Chem. 316, 61 (1959)
8. Dixon und Webb, Enzymes, 1958, S. 269
9. Waley, S. G. und Watson, J., Biochem. J. 55, 328, 1953
10. Levin, J., Beyer, A. und Katchalski, Biochem. J. 63, 308 (1956)
11. Fruton, J. S., Irving, G. W. Jr. und Bergmann, M., J. Biol. Chem. 141, 763 (1941)
12. Neurath, H. und Schwert, G. W., Chem. Rev. 46, 69 (1950)
13. Brand, E., Plentl, A. A. und Erlanger, B. F., Abstracts of Papers Presented at the 116th Meeting of the American Chemical Society, Atlantic City, New Jersey, September 1949, p. 27 C
14. Schleyer, Diss. Universität München, 1960
15. Bell, P. H., J. Am. Soc. 76, 5565 (1954)
16. Harris, J. I. und Lerner, B. A., Nature 179, 1346 (1957)
17. Hirs, C. H. W., Moore, S. und Stein, W. H., J. Biol. Chem. 235, 633 (1960)
18. Anderer, F. A., Uhlig, H., Weber, E. und Prof. Schramm, Nature, 186, 922 (1960)
19. Elliot, D. F., Lewis, G. P. und Horton, E. W., Biochem. J. 74, 15P (1960)
20. Sanger, F. und Tuppy, H., Biochem. J. 49, 481 (1951)
21. Harris, J. I. und Roos, P., Nature 178, 90 (1956)
22. Geschwind, I. I., Li, C. H. und Barnafi, J. Amer. Chem. Soc. 78, 4494 (1956)
23. Tuppy, H. und Bodo, G., Monatsh. 85, 1024 (1954)
24. Elliot, D. F., Lewis, G. P. und Norton, E. W., Biochem. J. 76, 15 P (1960)
25. Boissonas, R. A., Guttman, St. und Jaquenood, Helv. Chim. Acta 43, 1130 (1960)
26. Davie, E. W. und Neurath, H. I., Biol. Chem., 212, 515 (1955)
27. Curtius, Th. und Wüstenfeld, R. J., prakt. Chem. 70, 73 (1904)
28. Boissonas, R. A., Helv. Chim. Acta 34, 874 (1951)
29. Sheehan, J. C. und Frank, V. S., J. Amer. Chem. Soc. 71, 1856 (1949)

30. Goldschmidt, St., Angew. Chem. 62, 538 (1950)
Goldschmidt, St. u. Lautenschlager, H., Ann. 580, 68 (1953)
31. Graßmann, W., Wünsch, E., Deufel, P. u. Zwick, A.,
Chem. Ber. 91, 538 (1958)
32. Bergmann, M. u. Zervas, L., Ber. dtsh. chem. Ges.
65, 1192 (1932)
33. Helferich, B., Moog, L. u. Jünger, B. 58, 872 (1925)
34. Wünsch, E., Diss. München (1955)
35. Zahn, H. u. La France, N. H., Ann. 630, 26 (1960)
36. Schwyzer, R. u. Sieber, P. Helv. Chim. Acta 12, 972 (1959)
37. Graßmann, W. u. Wünsch, E., Chem. Ber. 91, 449 (1958)
Graßmann, W. u. Wünsch, E., Chem. Ber. 91, 455 (1958)
38. Smith, E. L. u. Bergmann, M. J., J. Biol. Chem.
153, 627 (1947)
39. Abderhalden, H. u. Nienburg, H., Fermentforschung
13, 573 (1933)
40. Rydon, H. N. u. Smith, P. W. G., J. Chem. Soc. 3642 (1956)
41. Bergmann, M., Zervas, L. u. I. S. Fruton, J. biol. Chem.
115, 593, (1936)
42. Bergmann, M., Zervas, L. u. Ross, W. F., J. Biol. Chem.
111, 245 (1935)
43. Zwick, A., Diss. Universität München (1958)
44. Fürst, G., Diplomarbeit Universität München (1955)
45. Hacker, E., Diplomarbeit Universität München (1958)
46. Hofmann, K., Rheiner, A. und Peckham, W. D.,
J. Amer. Chem. Soc. 75, 6083 (1953)
J. Amer. Chem. Soc. 78, 238 (1956)
47. Graßmann, W. u. Wünsch, E., Chem. Ber. 91, 462 (1958)
48. Neuberger, A. u. Sanger, F., Biochem. J. 37, 515 (1943)
49. Boissonas, R. A., Guttman, St., Huguenin, R. L.,
Jacquenoud, P. A. u. Sandrin, Ed., Helv. Chim. Acta
41, 1867 (1958)
50. Zahn, H. u. F. Schmidt, Makromolekulare Chem. 36, 1 (1960)
51. Synge, R. L. M., Biochem. J. 42, 99 (1948)
52. Graßmann, W. u. Heyde, W. Z. physiol. Chem. 183, 32 (1929)

Lebenslauf

Am 20. Mai 1926 wurde ich als 4. Kind der Eheleute Karl und Babette Grimm, geb. Medick, in Neusorg i. Fichtelgebirge geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Neusorg trat ich 1937 in die 6-klassige Oberschule für Jungen in Wunsiedel und 1943 in die Oberschule für Jungen in Marktredwitz über.

Im September 1943 wurde ich als Luftwaffenhelfer nach Nürnberg verpflichtet und nach einer kurzen Rückkehr zur Stammschule im Juli 1944 zur Wehrmacht einberufen.

Nachdem ich im Sommer 1947 an der Oberschule für Jungen in Kulmbach einen Sonderlehrgang für Kriegsteilnehmer mit der Reifeprüfung abgeschlossen hatte, begann ich mit dem Wintersemester 1947/48 das Hochschulstudium in Regensburg. Hier legte ich am 2. 7. 1952 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab. Am 6. Juli 1956 bestand ich die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung an der Universität in München. Im September 1956 begann ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit der Ausführung der Diplomarbeit, die ich im Februar 1958 beendete. Im Mai 1958 begann ich mit der Doktorarbeit am gleichen Institut.

Seit 1. November 1960 bin ich bei der Bildröhrenfabrik Valvo G. m. b. H, Aachen, tätig.



